



## La administración de NeuroEPO intranasal no afecta la estructura de la mucosa respiratoria en ratas Wistar

### Intranasal administration of NeuroEPO does not affect the structure of respiratory mucosa in Wistar rats

Ketty Suárez Borrás<sup>1\*</sup> , Gisselle Fernández Peña<sup>1</sup>   
Yamila Rodríguez Cruz<sup>1</sup> , Giselle Puldón Seguí<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Universidad de Ciencias Médicas de la Habana,  
Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [suarezkety42@gmail.com](mailto:suarezkety42@gmail.com)

#### Cómo citar este artículo

Suárez Borrás K, Fernández Peña G, Rodríguez Cruz Y, Puldón Seguí G. La administración de NeuroEPO intranasal no afecta la estructura de la mucosa respiratoria en ratas Wistar. Rev haban cienc méd [Internet]. 2022 [citado ]; 21(4):e4849. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/4849>

Recibido: 19 de Abril del año 2022  
Aprobado: 6 de Agosto del año 2022

#### RESUMEN

**Introducción:** Las enfermedades asociadas al Sistema Nervioso Central representan un grupo de padecimientos con importante repercusión social y económica. Las nuevas estrategias de tratamiento con NeuroEPO ofrecen nuevas oportunidades para prevenir la aparición y la progresión de estos desórdenes. La NeuroEPO administrada por vía intranasal puede alcanzar al Sistema Nervioso Central a través de varios mecanismos que involucran los nervios olfatorios y trigéminos, mucosa respiratoria y olfatoria, vasculatura nasal, fluido cerebroespinal y el sistema linfático.

**Objetivo:** Determinar el efecto de la administración intranasal de NeuroEPO sobre la estructura histológica de la mucosa respiratoria y de su tejido linfático asociado en ratas Wistar.

**Material y Métodos:** Se realizó un estudio experimental, descriptivo, longitudinal, prospectivo, utilizando la rata Wistar como modelo biológico. Se utilizaron diez animales sanos distribuidos aleatoriamente en dos grupos de cinco cada uno. Uno de los grupos recibió NeuroEPO intranasal durante 28 días a dosis de 300 µg/kg. Al otro grupo se le administró vehículo a una razón de 0,3 µl/g. Se estudiaron las características histológicas de la mucosa respiratoria. Las medianas de los grupos fueron comparadas mediante la prueba U de Mann-Whitney.

**Resultados:** No se observaron alteraciones en las características histológicas de la mucosa respiratoria ni del tejido linfático asociado a la mucosa nasal en ratas Wistar, tras la administración de la NeuroEPO.

**Conclusiones:** La administración intranasal de NeuroEPO no provoca cambios patológicos sobre la estructura histológica de la mucosa respiratoria ni del tejido linfático asociado a la mucosa nasal de ratas Wistar en nuestras condiciones experimentales.

#### Palabras claves:

NeuroEPO, mucosa respiratoria, enfermedades neurodegenerativas, neuroprotección,

#### ABSTRACT

**Introduction:** Diseases associated with the Central Nervous System represent a group of conditions with important social and economic repercussions. New treatment strategies with NeuroEPO offer new opportunities to prevent the onset and progression of these disorders. NeuroEPO administered intranasally can reach the Central Nervous System through various mechanisms involving the olfactory and trigeminal nerves, respiratory and olfactory mucosa, nasal vasculature, cerebrospinal fluid, and the lymphatic system.

**Objective:** To determine the effect of intranasal administration of NeuroEPO on the histologic structure of the respiratory mucosa and its associated lymphatic tissue in Wistar rats.

**Material and Methods:** An experimental, descriptive, longitudinal, prospective study was conducted, using the Wistar rat as a biological model. Ten healthy animals were randomly distributed in two groups of five animals each. One of the groups received intranasal NeuroEPO for 28 days at doses of 300 µg/kg. The other group was given a vehicle at a rate of 0,3µl/g. The histological characteristics of the respiratory mucosa were studied. The Mann-Whitney test was used to compare the means.

**Results:** No alterations in the histological characteristics of the respiratory mucosa and the lymphatic tissue associated with the nasal mucosa were observed in Wistar rats after the administration of NeuroEPO.

**Conclusion:** Intranasal administration of NeuroEPO does not cause pathological changes in the histological structure of the respiratory mucosa or the lymphatic tissue associated with the nasal mucosa of Wistar rats in our experimental conditions.

#### Keywords:

NeuroEPO, respiratory mucosa, neurodegenerative diseases, neuroprotection



## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades asociadas al Sistema Nervioso Central (SNC) representan un grupo de padecimientos con importante repercusión social y económica. Se caracterizan por una alta prevalencia tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. Las enfermedades cerebrovasculares (ECV) y las ocasionadas por degeneración neuronal atraen la atención de los principales centros de investigación. No existe en el mercado un tratamiento eficaz que logre la cura para dichas enfermedades.<sup>(1,2)</sup>

En la actualidad, son múltiples las investigaciones sobre los mecanismos neurobiológicos relacionados con el envejecimiento cerebral y las enfermedades asociadas a él. Los científicos continúan la búsqueda de métodos para mejorar su tratamiento, tanto clínico como psicosocial.<sup>(3,4)</sup>

A pesar del gran esfuerzo emprendido en el análisis de la fisiopatología de las afecciones neurológicas y al desarrollo de nuevos fármacos para tratar dichas afecciones, el éxito obtenido es limitado.<sup>(1,2,4)</sup> Una creciente línea de investigación en neurociencias es el empleo de moléculas recombinantes humanas. La eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico (NeuroEPO) constituye un ejemplo relevante del uso de estas moléculas.<sup>(1,2,3,4)</sup> La NeuroEPO tiene efecto citoprotector, hipoglucemiante y neuroprotector.<sup>(4,5,6,7)</sup>

La administración sistémica de NeuroEPO tiene la desventaja que resulta degradable de forma rápida a nivel hepático, por presentar menor cantidad de ácido siálico.<sup>(1,2,3)</sup> Es por esto que se han explorado otras vías como la intranasal, que evitaría su paso por el hígado.

Estudios recientes han demostrado que la NeuroEPO administrada por vía intranasal tiene un efecto neuroprotector en diferentes biomodelos de enfermedades neurológicas.<sup>(1,2,3,4,8)</sup> De igual manera se ha demostrado este efecto neuroprotector en ensayos clínicos controlados en la enfermedad de Parkinson y Alzheimer.<sup>(9,10)</sup>

Sin embargo, se desconoce si su aplicación intranasal en dosis mantenidas, por un periodo de tiempo más prolongado, podría provocar alteraciones en la estructura histológica de la mucosa respiratoria en ratas.

El **objetivo** de este estudio es determinar el efecto de la administración intranasal de NeuroEPO sobre la estructura histológica de la mucosa respiratoria y de su tejido linfático asociado, en ratas Wistar.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental, longitudinal y prospectivo. El experimento fue realizado por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) y el Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón" (ICBP-UCMH) entre 2016 y 2017.

Se utilizaron ratas Wistar como modelo biológico, de aproximadamente 21 días de edad y peso entre 150-175 g, núlparas y no grávidas, procedentes del Centro Nacional para la producción de animales de Laboratorio (CENPALAB). Los animales se mantuvieron en el área de experimentación animal del Bioterio, con condiciones controladas de temperatura (19-25 °C) y humedad relativa 40-70 %, ciclos de luz-oscuridad 12/12h y acceso a agua y comida *ad libitum*.<sup>(11)</sup> El experimento se realizó con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CENPALAB.

### Formulación NeuroEPO

La formulación nasal de NeuroEPO (patentes PCT / cu2006 / 000001 y 20050138 al CIDEM, La Habana, Cuba)<sup>(12)</sup> fue preparada por el Centro de Investigaciones para el Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) y suministrada por el Centro de Inmunología Molecular (CIM), a través de la comercializadora de productos biofarmacéuticos de este centro (La Habana, Cuba). El IFA (Ingrediente Farmacéutico Activo) de esta formulación es rHu-EPO con bajo contenido de ácido siálico, contiene además el polímero bioadhesivo D-hidroxi-propilcelulosa, para aumentar el tiempo de residencia en la cavidad nasal y disminuir su eliminación por el movimiento ciliar. Esta se diluyó en solución salina tampón fosfato (pH 7,0) a 0,15 mM. La formulación nasal contiene además otros excipientes para la estabilidad de la formulación: cloruro de benzalconio como preservante para evitar la contaminación microbiológica para regular la presión osmótica.<sup>(12)</sup> El vehículo fue suministrado por el Centro de Investigaciones para el Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) y contenía todas las sustancias (excipientes) excepto NeuroEPO.

Un total de diez animales sanos se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos de cinco animales cada uno, de la siguiente manera:

1. Grupo control, que se trataron con solución vehículo por vía intranasal.
2. Grupo tratado, a los cuales se le administró NeuroEPO 300 µg/Kg, volumen (10 µL) por vía intranasal.

### Aplicación intranasal (IN)

Las ratas de ambos grupos se sometieron a tratamiento intranasal (IN). El animal fue inmovilizado, colocado en posición supina y con una pipeta automática se administró la formulación en cada fosa nasal lentamente; el tiempo aproximado de aplicación fue de uno a dos minutos. El tratamiento se realizó durante 28 días, momento en que se realizó la eutanasia.

Al grupo control se le administró vehículo a una razón de 0,3 µl/g. El grupo tratado recibió 300 µg/kg/día, de NeuroEPO. Esta dosis fue obtenida a partir de la dosis de EPO recombinante aplicada en humanos de 48 µg/kg/día o 1000 UI/kg/día, lo cual representa el doble de la dosis que se usa para estimular la eritropoyesis.<sup>(9,13)</sup>

## Procesamiento y tinción de las estructuras nasales para su estudio histológico

Se extrajeron las estructuras nasales, las cuales fueron lavadas con solución cloruro sodio a 0.9 % y fijadas en formol neutro a 4 %. Posteriormente, fueron descalcificadas con ácido fórmico durante 14 días. Las muestras de tejido para examen histopatológico fueron obtenidas del tercer nivel (T3) de la cavidad nasal; se tomó como referencia las estructuras palatinas (a través de la segunda cresta palatina e incluye el primer molar superior).<sup>(14,15)</sup> Las muestras se procesaron por el método convencional de inclusión en parafina.<sup>(16,17)</sup>

Se obtuvieron cuatro láminas por animal, con tres cortes de cinco  $\mu\text{m}$  de grosor cada una, obtenidos en un micrótopo Histo-Line Laboratories MR 300 con cuchillas de acero. Se utilizaron las técnicas de coloración: hematoxilina y eosina (tres láminas), y PAS /Azul de Alcían (una lámina).

### Estudio histológico cualitativo

Los cortes fueron observados bajo un microscopio óptico Motic BA 210 Digital a 100x, 400x, y 1000x en busca de cambios morfológicos tanto del epitelio como de la lámina propia de la mucosa respiratoria. En cada corte se observaron diez campos por animal escogidos al azar. Se realizó una valoración general de todo el corte, se analizaron aspectos relacionados con la forma, tamaño, coloración y disposición de las estructuras, además se tuvo en cuenta la presencia de posibles cambios inflamatorios o degenerativos.<sup>(18)</sup>

### Estudio morfométrico de la mucosa respiratoria

Se realizó el estudio cuantitativo de la mucosa respiratoria donde se efectuó la morfometría del epitelio; se determinó su altura a partir de la membrana basal, hasta la superficie apical sin incluir los cilios. De igual manera, se determinó el grosor de la lámina propia.

El estudio morfométrico de la mucosa respiratoria fue analizada a nivel de los senos maxilares, conducto nasofaríngeo y porción ventral del tabique medio. Para la digitalización de las imágenes, se utilizó un microscopio Motic BA 210 Digital, con objetivo 10x, 40x y 100x, tubo de proyección *Widelfield binocular 300 (F.N.20) Light distribution 100. /20.80* y una cámara digital modelo *Moticam* de alta resolución acoplada al microscopio, equipado con un *software* de análisis de datos con USB 2.0 de entrada a una computadora. Para el análisis morfométrico se utilizó el programa *Imagen Tool* versión 3 para Windows.<sup>(19)</sup>

### Análisis estadístico

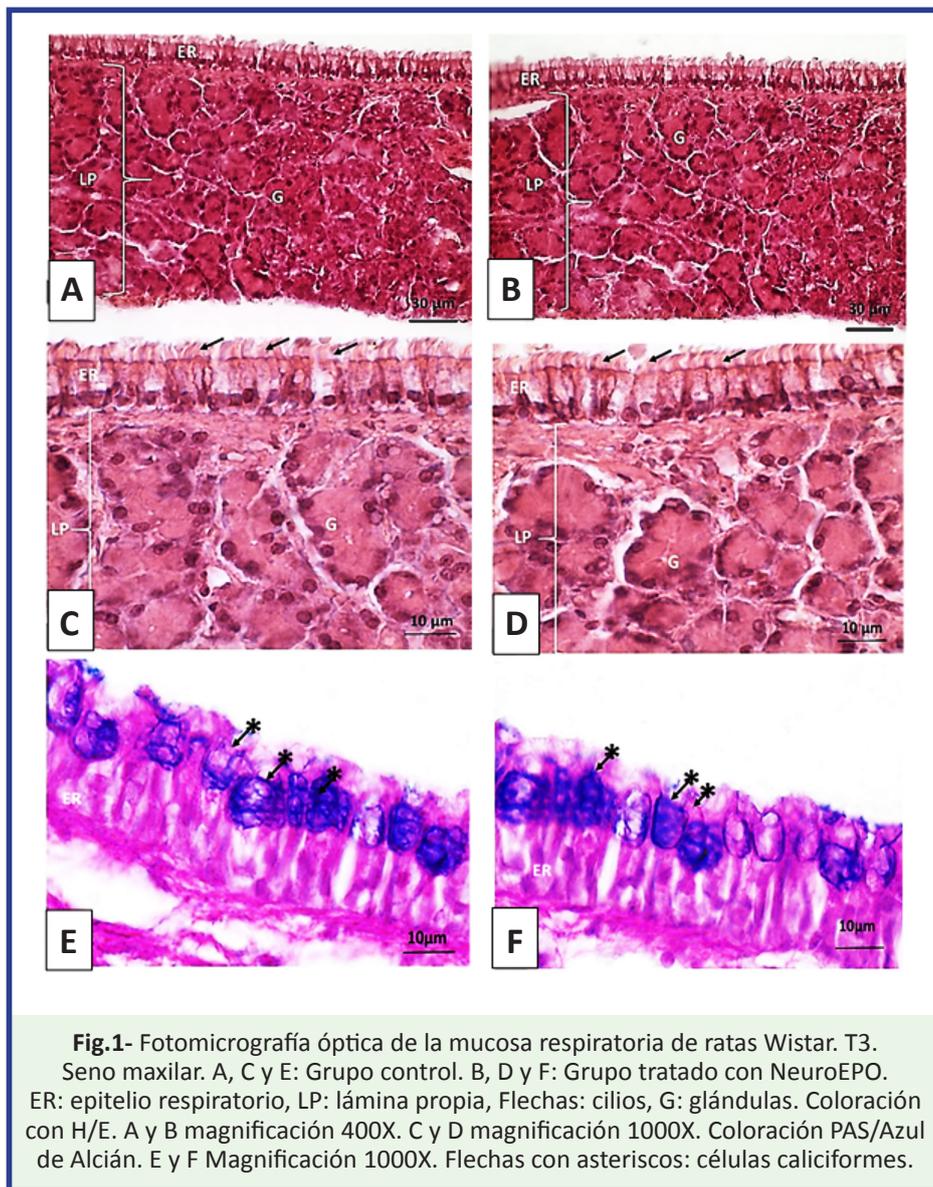
Los valores de las variables fueron recogidos en base de datos; se utilizó el programa Microsoft Excel. Los resultados de las variables se procesaron utilizando el *software* estadístico Grafpad Prism versión 5.01 para Windows.<sup>(20)</sup> Se determinaron como estadígrafos descriptivos la media y la desviación estándar. Se realizaron a todos los datos pruebas de normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov). Como estos no mostraron distribución normal, se empleó la prueba de Mann-Whitney para comparar las medias. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas para una  $p < 0,05$ .

Los datos primarios de esta investigación se encuentran depositados en Mendeley Data como principio abierto a la información.<sup>(21)</sup>

## RESULTADOS

### Características histológicas de la mucosa respiratoria observadas al microscopio óptico de campo brillante

En la mucosa respiratoria del grupo tratado con NeuroEPO no se evidenció la presencia de infiltración inflamatoria, ni signos de fibrosis. El epitelio de revestimiento pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes en toda su extensión mostró un patrón morfológico normal. Se observaron las células caliciformes secretoras de mucus de características histológicas normales. En la lámina propia subyacente se evidenciaron vasos sanguíneos y glándulas seromucosas abundantes con acinos bien constituidos de aspecto morfológico normal. Estos resultados se corresponden con lo mostrado en el grupo control. (**Fig. 1**).

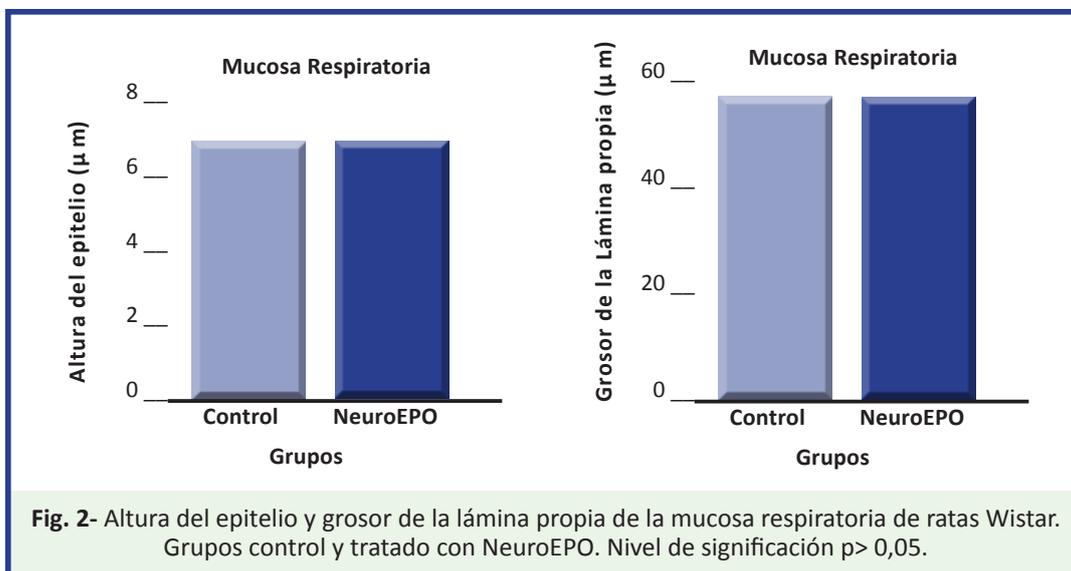


**Fig.1-** Fotomicrografía óptica de la mucosa respiratoria de ratas Wistar. T3. Seno maxilar. A, C y E: Grupo control. B, D y F: Grupo tratado con NeuroEPO. ER: epitelio respiratorio, LP: lámina propia, Flechas: cilios, G: glándulas. Coloración con H/E. A y B magnificación 400X. C y D magnificación 1000X. Coloración PAS/Azul de Alcian. E y F Magnificación 1000X. Flechas con asteriscos: células caliciformes.

**Estudio Morfométrico**

**Altura del epitelio respiratorio y grosor de la lámina propia**

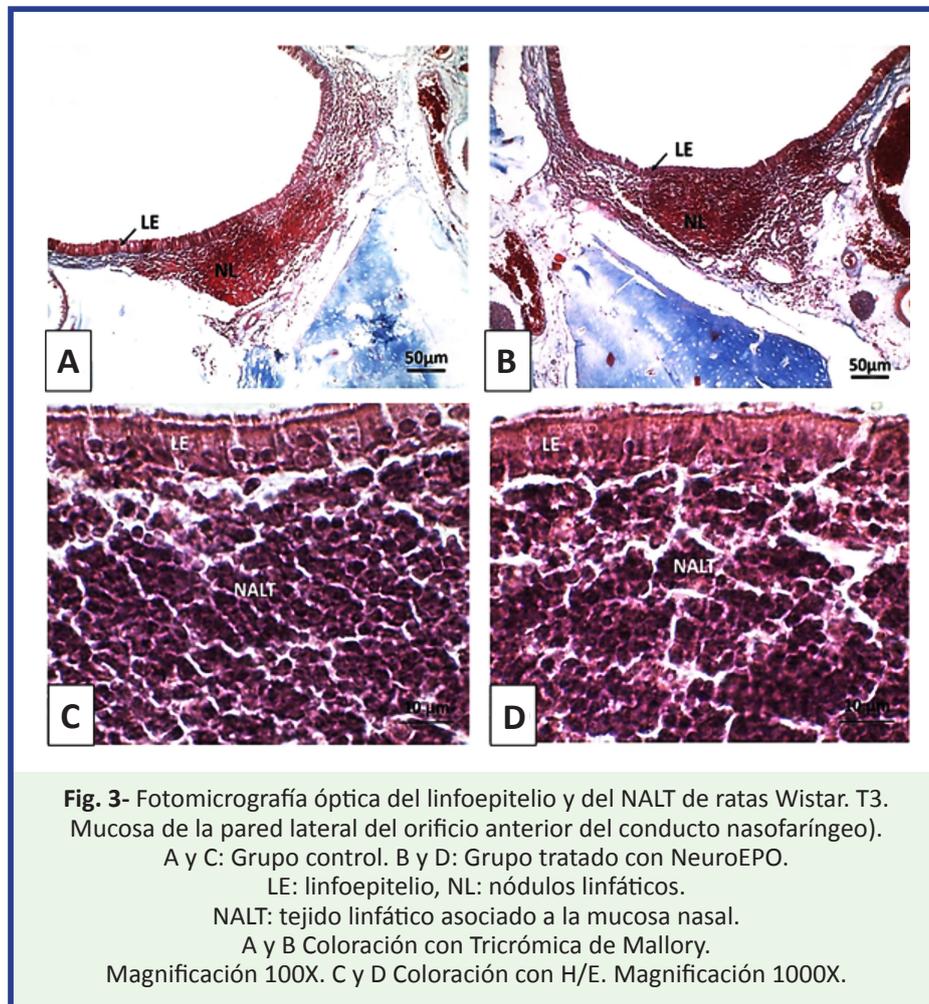
La altura del epitelio respiratorio, y el grosor de la lámina propia de la mucosa respiratoria se comportó de manera similar en los grupos control y tratado con NeuroEPO. (Fig. 2).



**Fig. 2-** Altura del epitelio y grosor de la lámina propia de la mucosa respiratoria de ratas Wistar. Grupos control y tratado con NeuroEPO. Nivel de significación  $p > 0,05$ .

### Características histológicas del linfoepitelio y el tejido linfático asociado a la mucosa nasal (NALT) observadas al microscopio óptico de campo brillante

Las características histológicas observadas en el linfoepitelio y en el NALT de las ratas de este grupo fueron normales. El linfoepitelio que recubre los agregados de folículos linfáticos mostró características morfológicas típicas. Los folículos linfáticos mostraron forma y tamaño similar a los del grupo control. Se observaron linfocitos de aspecto morfológico normal. (Fig. 3).



## DISCUSIÓN

### Mucosa respiratoria

En la presente investigación, no se observaron cambios en las características histológicas del epitelio ni de la lámina propia de la mucosa respiratoria; de igual manera no se evidenciaron signos indicativos de respuesta inflamatoria aguda o crónica con la administración intranasal de NeuroEPO a ratas Wistar. Los grupos control y tratado exhibieron similares características morfológicas.

No existen estudios previos que describan el efecto de la administración intranasal de NeuroEPO en la estructura de la mucosa respiratoria. En estudios con otras moléculas como cloro gaseoso, ozono, formaldehído y xileno, la exposición provoca pérdida de cilios, metaplasia de células calciformes, hiperplasia de células escamosas, degeneración, necrosis epitelial e infiltración inflamatoria. También se ha descrito proliferación epitelial regenerativa con o sin metaplasia escamosa y respuesta inflamatoria asociada.<sup>(22,23,24,25,26)</sup>

Los resultados del actual estudio difieren de algunos reportes que sugieren que el uso prolongado de algunos fármacos por vía nasal desencadena rinitis medicamentosa, caracterizada por metaplasia escamosa del epitelio respiratorio y/o ulceración, células calciformes incrementadas y membrana basal engrosada e hialinizada. La lámina propia de la mucosa respiratoria en estos casos puede exhibir edema o fibrosis con un infiltrado difuso de linfocitos, histiocitos y eosinófilos. Tal es el caso de algunos descongestionantes nasales, como la oximetasonina, fenilefrina<sup>(27)</sup> y antiinflamatorios como la mometasona y la fluticasona en spray nasal.<sup>(28)</sup>

Estudios recientes han evaluado el efecto de la administración intranasal de NeuroEPO sobre la mucosa nasal y olfatoria en ratas (tras 14 y 28 días respectivamente).<sup>(29,30)</sup> Ambos estudios evidenciaron que la administración de NeuroEPO no afectó la morfología de las estructuras exploradas.

En el estudio morfométrico de la mucosa respiratoria, no se observaron diferencias significativas en la altura del epitelio respiratorio y el grosor de la lámina propia en los grupos en estudio. Los reportes de la literatura revisada no describen los efectos que tiene la administración de NeuroEPO sobre la morfometría de la mucosa respiratoria y que pudieran ser comparados con la presente investigación. Los resultados difieren de algunos trabajos realizados en animales de experimentación en los cuales se ha reportado disminución del epitelio respiratorio corroborada con la morfometría, en ratas expuestas al etanol.<sup>(31)</sup> De igual manera se ha evidenciado hiperplasia glandular con aumento en el grosor de la lámina propia de la mucosa respiratoria de ratones expuestos al péptido catelicidina.<sup>(32)</sup>

Es probable que los resultados obtenidos en el presente estudio estén relacionados con el hecho de que la distribución de las lesiones en la cavidad nasal depende de la dosis local utilizada y de la susceptibilidad de los tejidos al daño. El epitelio respiratorio es menos susceptible al daño por agentes químicos, que otros de los epitelios de la cavidad nasal; además la dosis utilizada y el tiempo de exposición a esta pudieron haber influido sobre los actuales resultados.<sup>(33)</sup>

En la presente investigación, los grupos control y tratado mostraron un patrón morfológico normal del epitelio y la lámina propia de la mucosa respiratoria corroborado con el estudio morfométrico. No se observó signos de inflamación aguda o crónica en los grupos de estudio; esto sugiere que la NeuroEPO administrada por vía nasal a dosis de 300 µg/kg/día durante 28 días no produce alteraciones sobre la mucosa respiratoria en ratas Wistar.

En nuestro estudio no se observaron cambios en la estructura histológica del linfoepitelio de las ratas expuestas a altas dosis de NeuroEPO nasal, comportándose de manera similar al grupo control. Al realizar la observación de las características histológicas del NALT, se pudo apreciar que su forma y tamaño eran similares en ambos grupos.

No se encontraron en la literatura revisada reportes acerca de los efectos de la NeuroEPO sobre el linfoepitelio y NALT en ratas, que pudieran ser comparados con los de la actual investigación. No obstante, los resultados actuales difieren de algunos estudios realizados, en los cuales se ha reportado que los animales expuestos a tóxicos por vía nasal desencadenaron alteraciones en el sistema inmune, al poco tiempo de su exposición, entre estas se encuentran: disminución en el número de linfocitos intraepiteliales, y de linfocitos presentes de los folículos linfáticos. Estos cambios repercutieron en la forma y el tamaño del NALT de los animales en estudio.<sup>(34,35)</sup>

Algunos autores describen alteraciones en el linfoepitelio de ratas expuestas a xenobióticos o irritantes por vía nasal, como por ejemplo necrosis superficial y metaplasia escamosa, así como hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes.<sup>(30)</sup>

Ratas expuestas a concentraciones elevadas de formaldehído inhalado, han evidenciado hiperplasia del linfoepitelio. El NALT en estos casos mostró disminución de la celularidad de linfocitos T y B.<sup>(36)</sup>

Uno de los mecanismos a través de los cuales un tóxico provoca alteraciones sobre el sistema inmunitario está relacionado con el estrés que este genera sobre las células. El sistema nervioso simpático es esencial para restaurar la homeostasis, alterada por el estrés y para promover la sobrevivencia del organismo. Para cada tipo de agente agresor se genera determinado tipo de respuesta específica.<sup>(37,38)</sup> El estrés provoca un incremento de la secreción de hormonas glucocorticoides y catecolaminas por activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Estas hormonas interactúan con receptores de las células inmunitarias y ocasionan cambios en su respuesta que incluyen modificaciones en el tráfico y proliferación celular, cambios en la secreción de citoquinas, anticuerpos y en la actividad citolítica.<sup>(39)</sup>

El cortisol es el principal glucocorticoide involucrado en la inmunomodulación, el cual ejerce efecto directo sobre la mayoría las células del sistema inmunitario. La hormona se une a receptores citoplasmáticos y forma complejos hormona-receptor que entran al núcleo y regulan la transcripción de genes, lo que ocasiona efectos inmunosupresores y antiinflamatorios. El sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo hipófisis adrenal provoca supresión de las respuestas de la fase aguda y de la inmunidad mediada por células.<sup>(37,38,39)</sup>

Los glucocorticoides inhiben la mielopoyesis y la expresión de moléculas del MHC de clase II inducida por el INF gamma en los macrófagos e inhiben la producción de varias citocinas (IL-1, IL-6, TNF) y eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos) proinflamatorios sobre estas células. De igual manera, suprimen la función de los linfocitos Th1 sin un efecto inhibitorio notable sobre los Th2.<sup>(36,37,38)</sup>

Uno de los factores que interviene en la inmunogenicidad es la concentración del fármaco. En el presente estudio se utilizó una dosis alta, según se reporta en la literatura.<sup>(13)</sup> Sin embargo, no se observó efecto sobre el linfoepitelio ni el NALT. Esto pudiera estar relacionado con una respuesta de tipo tolerogénica y favoreció una tolerancia inmunológica.<sup>(18)</sup> Este hecho puede estar relacionado con que la estructura de la NeuroEPO es muy similar a la de la EPO endógena (por su origen recombinante humano).

Como resultado de la presente investigación, se puede plantear que la NeuroEPO administrada por vía nasal a dosis de 300 µg/kg/día durante 28 días no produce alteraciones sobre el linfoepitelio y el NALT en ratas Wistar.

Esta investigación se *limitó* a la evaluación de la administración nasal de NeuroEPO en la estructura histológica de la mucosa respiratoria y NALT, pero se podrían abordar más investigaciones para evaluar el efecto en aspectos funcionales.

## CONCLUSIONES

La administración de NeuroEPO por vía nasal a dosis de 300 µg/kg/día durante 28 días no provoca daños sobre la estructura histológica en la mucosa respiratoria ni del tejido linfático asociado a la mucosa nasal de ratas Wistar.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garzón F, Rodríguez Y, García JC, Rama R. Neuroprotective Effects of neuroEPO Using an In Vitro Model of Stroke. *Behav Sci.* 2018;8(2):26.
2. Rama R, Garzón F, Rodríguez Cruz Y, Maurice T, García Rodríguez JC. Neuroprotective effect of Neuro-EPO in neurodegenerative diseases: "Aleajactaest." *Neural Regen Res* [Internet]. 2019 Sep [Citado 04/02/2022];14(9):1519. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6557108/>
3. Rey F, Balsari A, Giallongo T. Erythropoietin as a Neuroprotective Molecule: An Overview of Its Therapeutic Potential in Neurodegenerative Diseases. *ASN Neuro* [Internet]. 2019 [Citado 04/02/2022];11:1759091419871420. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6712762/>
4. Zucchella C, Sinfiorani E, Tamburin S, Federico A, Mantovani E, Bernini S, et al. The Multidisciplinary Approach to Alzheimer's Disease and Dementia. A Narrative Review of Non-Pharmacological Treatment. *Front Neurol* [Internet]. 2018 Dec [Citado 04/02/2022];9:1058. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6300511/>
5. Fernández Romero T, Clapés Hernández S, Pérez Hernández CL, Barreto López JJ, Fernández Peña G. Efecto hipoglicemiante de la NeuroEPO en ratas con y sin diabetes mellitus. *Rev haban cienc méd* [Internet]. 2022 [Citado 17/04/2022];21(1):e4617. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/4617>
6. Ul Islam S, Shehzad A, Bilal Ahmed M, Lee YS. Intranasal Delivery of Nanoformulations: A Potential Way of Treatment for Neurological Disorders. *Molecules* [Internet]. 2020 Apr [Citado 04/02/2022];25(8):[Aprox. 2 p.]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32326318/>
7. Fernández Romero T, Clapés Hernández S, Pérez CL, Núñez López N, Suárez Román G, Fernández G. Protective effect of NeuroEPO in the reproduction of diabetic rats. *Rev haban cienc méd* [Internet]. 2022 [Citado 08/08/2022];21(4):[Aprox. 6 p.]. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/4797>
8. Rodríguez Y, Strehaiano M, Rodríguez T, García JC, Maurice T. An intranasal formulation of erythropoietin (Neuro-EPO) prevents memory deficits and amyloid toxicity in the APPSwe transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2017;55(1):231-48. Disponible en: <https://www.doi.org/10.3233/JAD-160500>
9. Vega MLB, Shengnan L, Leon YR, Rodríguez AM, Fernández EC, Llano MG, et al. NeuroEPO improves cognition in Parkinson's disease. Preliminary report. *medRxiv* [Internet]. New York: medRxiv; 2022 [Citado 17/04/2022]. Disponible en: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.02.24.22271444v2>
10. Pérez L, Sosa S, Valenzuela C, Bringas G, Urrutia N, Peñalver AI, et al. Clinical trial of neuroEPO in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2021;17:e050212. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/alz.050212>
11. McCormick-Ell J, Connell N. Laboratory safety, biosecurity, and responsible animal use. *ILAR journal* [Internet]. 2019;60(1):24-33. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/ilar/ilz012>
12. Muñoz Cernada A, García Rodríguez JC, Núñez Figueredo Y, Pardo Ruiz Z, García Selman JD, Sosa Testé I, et al. Formulaciones nasales de EPORh con bajo contenido de ácido siálico para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central [Internet]. La Habana: WO2007009404, 2007 [Citado 17/04/2022]. Disponible en: <https://patentscope.wipo.int/search/es/detail.jsf?docId=WO2007009404>
13. Tveden Nyborg P, Lykkesfeldt J. Animal Models in Pharmacology and Toxicology. In: *Handbook of Laboratory Animal Science* [Internet]. Florida: CRC Press; 2021 [Citado 25/07/2022]. p. 665-94. Disponible en: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9780429439964-30/animal-models-pharmacology-toxicology-pernille-tveden-nyborg-jens-lykkesfeldt>
14. Uraih LC, Maronpot RR. Normal histology of the nasal cavity and application of special techniques. *Environ Health Perspect* [Internet]. 1990;85:187-208. Disponible en: <https://www.doi.org/10.1289/ehp.85-1568325>
15. Young JT. Histopathologic examination of the rat nasal cavity. *Fundam Appl Toxicol* [Internet]. 1981;1(4):309-12. Disponible en: [https://www.doi.org/10.1016/s0272-0590\(81\)80037-1](https://www.doi.org/10.1016/s0272-0590(81)80037-1)
16. Grada A, Mervis J, Falanga V. Research techniques made simple: animal models of wound healing. *Journal of Investigative Dermatology* [Internet]. 2018;138(10):2095-105.e1. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.08.005>
17. Verma A, Verma M, Singh A. Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology* [Internet]. 2020:269-93. Disponible en: <http://www.doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4>
18. Abbas KA, Lichtman HA, Pillai S. Células y tejidos del sistema inmunitario. En: *Inmunología celular y molecular*. 7 ed. Barcelona: Elsevier Saunders; 2012.p.15-32.
19. Dan Wilcox, Brent Dove. UTHSCSA image tool (3.0) [Internet]. USA: Informer Technologies, Inc; 2022 [Citado 25/07/2022]. Disponible en: <https://imagetool.software.informer.com/Descargar-gratis/>
20. Motulsky H, Chistopoulos A, Miller JR. Graphpad Prism Version 5.0 Software Inc, USA [Internet]. San Diego: GraphPad; 2022 [Citado 25/07/2022]. Disponible en: <https://www.graphpad.com>
21. Suarez K, Fernández G, Rodríguez Y, Pulton G (2022), "Administration of intranasal NeuroEPO does not affect the structure of the respiratory mucosa in Wistar rats" [Internet]. Amsterdam: Mendeley Data; 2022. Disponible en: <http://doi.org/10.17632/c5zhgv532g.1>
22. Jiang XZ, Buckley LA, Morgan KT. Pathology of toxic responses to the RD50 concentration of chlorine gas in the nasal passages of rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 1983;71(2):225-36. Disponible en: [http://www.doi.org/10.1016/0041-008x\(83\)90339-3](http://www.doi.org/10.1016/0041-008x(83)90339-3)
23. Harkema JR, Wagner JG. Innate Lymphoid Cell-Dependent Airway Epithelial and Inflammatory Responses to Inhaled Ozone: A New Paradigm in Pathogenesis. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2019;47(8):993-1003. Disponible en: <http://www.doi.org/10.1177/0192623319873872>

24. Edrissi B, Taghizadeh K, Moeller BC, Yu R, Kracko D, Doyle Eisele M, et al. N6-Formyllysine as a Biomarker of Formaldehyde Exposure: Formation and Loss of N6-Formyllysine in Nasal Epithelium in Long-Term, Low-Dose Inhalation Studies in Rats. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2017;30(8):1572-6. Disponible en: <http://www.doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00075>
25. Tesfaye S, Hamba N, Gerbi A, Negeri Z. Oxidative Stress and Carcinogenic Effect of Formaldehyde Exposure: Systematic Review & Analysis. *Endocrinol Metab Syndr* [Internet]. 2020 Sep [Citado 04/02/2022];9(6):1-11. Disponible en: <https://www.longdom.org/open-access/oxidative-stress-and-carcinogenic-effect-of-formaldehyde-exposure-systematic-review-analysis-58212.html>
26. Eda A, Bayer S, Seyla SB, Hüseyin Ö, Devenci E. Effects of Xylene on Respiratory Mucosa in Rats. *Int J Morphol* [Internet]. 2016 Sep [Citado 04/02/2022];34(3):934-8. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-95022016000300019&lng=en&nrm=iso&tling=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022016000300019&lng=en&nrm=iso&tling=en)
27. Horak F, Zieglmayer UP, Zieglmayer R, Kavina A, Marschall K, Munzel U, et al. Azelastine nasal spray and desloratadine tablets in pollen-induced seasonal allergic rhinitis: a pharmacodynamic study of onset of action and efficacy. *Curr Med Res Opin* [Internet]. 2006;22(1):151-7. Disponible en: <http://www.doi.org/10.1185/030079906X80305>
28. Small P, Keith PK, Kim H. Allergic rhinitis. *Allergy Asthma Clin Immunol* [Internet]. 2018 [Citado 04/02/2022];14(2):1-11. Disponible en: <https://aacjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13223-018-0280-7>
29. Lagarto A, Bueno V, Guerra I, Valdés O, Couret M, López R, et al. Absence of hematological side effects in acute and subacute nasal dosing of erythropoietin with a low content of sialic acid. *Exp Toxicol Pathol* [Internet]. 2011 [Citado 04/02/2022];63(6):563-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20488687/>
30. Rodríguez Cruz Y, Suárez Borrás K, Fernández Peña G, Puldón Seguí G. Efectos de la NeuroEPO sobre las características histológicas de la mucosa olfatoria en ratas wistar. En: Congreso MorfoVirtual 2020 [Internet]. La Habana: Sociedad Cuabana de Ciencias Morfológicas; 2020 [Citado 25/07/2022]. Disponible en: <http://www.morfovvirtual2020.sld.cu/index.php/morfovvirtual/morfovvirtual2020/paper/view/25/>
31. Marcondes de Godoy M, Lopes RA, Sala MA, Vinha D, Regalo SCH. Acción del Etanol sobre el Epitelio Nasal y Glándulas Septales de Ratas, Durante la Lactancia. *Int J Morphol* [Internet]. 2005 [Citado 04/02/2022];23(4):293-300. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-95022005000400002&lng=es&nrm=iso&tling=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022005000400002&lng=es&nrm=iso&tling=es)
32. Alt JA, Qin X, Pulsipher A, Orb Q, Orlandi RR, Zhang J, et al. Topical cathelicidin (LL-37) an innate immune peptide induces acute olfactory epithelium inflammation in a mouse model. *Int Forum Allergy Rhinol* [Internet]. 2015 Dec;5(12):1141-50. Disponible en: <http://www.doi.org/10.1002/alar.21634>
33. Chamanza R, Wright J. A review of the comparative anatomy, histology, physiology and pathology of the nasal cavity of rats, mice, dogs and non-human primates. Relevance to inhalation toxicology and human health risk assessment. *Journal of Comparative Pathology* [Internet]. 2015;153(4):287-314. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.08.009>
34. Elmore SA. Enhanced Histopathology Evaluation of Lymphoid Organs. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2018 [Citado 30/03/2022];1803:147-68. Disponible en: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-8549-4\\_10](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-8549-4_10)
35. Elmore SA. Enhanced Histopathology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2006 Jun [Citado 30/03/2022];34(5):687-96. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1080/01926230600939989>
36. Frieke Kuper C, van Oostrum L, Ma-Hock L, Durrer S, Woutersen RA. Hyperplasia of the lymphoepithelium of NALT in rats but not in mice upon 28-day exposure to 15ppm formaldehyde vapor. *Exp Toxicol Pathol* [Internet]. 2011;63(1):25-32. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0940299309002437>
37. Marino JH, Teague TK. The Immune System as a Sensor and Regulator of Stress: Implications in Human Development and Disease. En: *Biobehavioral Markers in Risk and Resilience Research* [Internet]. Switzerland: Springer; 2019. p. 1-11. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-05952-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-05952-1_1)
38. Kuper CF, Wijnands MVW, Zander SAL. Mucosa-Associated Lymphoid Tissues BT - Immunopathology in Toxicology and Drug Development. En: Parker GA, ed. *Organ Systems* [Internet]. Switzerland: Springer International Publishing; 2017. p. 81-121. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47385-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47385-7_4)
39. Pacák K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* [Internet]. 2001 Aug;22(4):502-48. Disponible en: <http://www.doi.org/10.1210/edrv.22.4.0436>

#### Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

#### Contribución de autoría

Ketty Suarez Borrás: Conceptualización, curación de datos, investigación; metodología; análisis formal; redacción del borrador original; redacción, revisión y edición.

Gisselle Fernández Peña: Conceptualización, curación de datos, investigación; metodología; análisis formal; redacción del borrador original; redacción, revisión y edición.

Yamila Rodríguez Cruz: curación de datos; análisis formal; adquisición de fondos; redacción del borrador original; redacción, revisión y edición.

Giselle Puldón Seguí: curación de datos; análisis formal; redacción del borrador original; redacción, revisión y edición.

Todas las autoras participamos en la discusión de los resultados y hemos leído, revisado y aprobado el texto final.